



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 C12N 15/12, 1/21, 5/10, C07K 14/47</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/13074</p> <p>(43) 国際公開日 1999年3月18日(18.03.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/04011</p> <p>(22) 国際出願日 1998年9月7日(07.09.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/242921 1997年9月8日(08.09.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 大正製薬株式会社 (TAISHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒170-8633 東京都豊島区高田3丁目24番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 吉本 真(YOSHIMOTO, Makoto)(JP/JP) 矢崎まどか(YAZAKI, Madoka)(JP/JP) 松本佳代(MATSUMOTO, Kayo)(JP/JP) 高山喜好(TAKAYAMA, Kiyoshi)(JP/JP) 釣谷克樹(TSURITANI, Katsuki)(JP/JP) 〒170-8633 東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製薬株式会社内 Tokyo, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 北川富造(KITAGAWA, Tomizo) 〒170-8633 東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製薬株式会社 特許部内 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, CN, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: PROTEIN HAVING ACTIVITY OF ACTIVITING NERVE CELL FUNCTIONS</p> <p>(54)発明の名称 神経細胞機能賦活化活性を有する蛋白質</p> <p>(57) Abstract A gene hucep-14 encoding a novel protein HUCEP-14 having the activity of activating nerve cell functions and obtained by cloning a human cerebral cortex-derived cDNA library; and the novel protein HUCEP-14 obtained by culturing a tranformant constructed by using an expression vector containing the above gene. This protein is useful as a nerve cell function activator.</p>		

(57)要約

ヒト大脳皮質由来のcDNAライブラリーからのクローニングによって神経細胞賦活化活性を有する新規蛋白質HUCEP-14をコードする遺伝子hucp-14が得られ、該遺伝子を有する発現ベクターによる形質転換体の培養により、新規蛋白質HUCEP-14が得られる。該蛋白質は、神経細胞賦活化活性物質として有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュー・ジーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		

明細書

神経細胞機能賦活化活性を有する蛋白質

技術分野

本発明は、神経細胞機能に対して賦活化活性を有する、蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、および該遺伝子を発現させるための組み換えDNAに関するものである。

背景技術

神経変性疾患の多くは、神経細胞又は神経細胞間の信号伝達に異変が生じることにより、神経細胞が死滅し発症するとされている。

このような神経変性疾患の代表例として、パーキンソン病やアルツハイマー病が挙げられる。パーキンソン病は、黒質神経細胞が変性して神経伝達物質の一つであるドーパミンが産成されなくなり、ドーパミン作動性の神経細胞が死ぬことにより発症するとされている。一方、アルツハイマー病は主に大脳皮質や海馬の神経細胞が死ぬことによって痴呆症状を呈するとされている。

以上に述べた疾病に対しては、その原因が明確にされていないことから有効な治療薬がなく、対症療法しか行えないのが現状であり、現在これらの疾患にともなう神経細胞死の原因を明らかにすべく多くの研究がなされているが、未だ解明されていない。

発明の開示

上記諸疾患の原因であると考えられる神経細胞死のメカニズムを解明し、これに関与する蛋白質及びそれをコードする遺伝子を特定することは、神経細胞死に起因する疾患の根本的な治療薬を探索する上で、きわめて重要なことである。例えば、神経細胞死に関与する蛋白質それ自体に有効な医

薬となり得る可能性があることは勿論、このような蛋白質は、該蛋白質の機能と同様の機能を有する物質、当該機能を阻害又は促進する作用を有する物質等を医薬として開発するに際しても、極めて有用である。以上の観点から、神経細胞死に関与する蛋白質とその機能の解明が望まれている。

本発明者らは、神経細胞の生存あるいは神経細胞の機能の維持に関与する蛋白質の同定を目的とし、ヒト脳組織で特異的に発現している遺伝子にコードされている蛋白質の中から、所望の神経細胞機能の維持に関与する蛋白質を把握するべく鋭意研究の結果、新規蛋白質（以下、HUCEP-14とする）の存在とそれをコードする遺伝子（以下、hucp-14とする）の単離に成功した。そして、このHUCEP-14が神経細胞機能賦活化活性を有し、神経変性疾患に関与するものであることを突き止め、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、（a）配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなる、神経細胞機能賦活化活性を有する新規蛋白質HUCEP-14、又は（b）配列番号：1のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ神経細胞機能賦活化活性を有する蛋白質に関するものである。

さらに本発明は、上記（a）又は（b）に表された蛋白質をコードする遺伝子、に関するものである。

さらに本発明は、（c）配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNA；又は、（d）配列番号：2のDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ神経細胞機能賦活化活性を有する蛋白質をコードするヒト由来のDNAに関するものである。

さらに本発明は上記遺伝子を含有する組み換えベクターを含む形質転換体に関するものである。

図面の簡単な説明

図1はDNA断片を示し、配列-1は脳皮質のcDNAライブラリーより得られる組み換え体中で高い発現頻度を示すDNA断片を表し、配列-2は配列-1を含むDNA断片のクローニングに用いたオリゴヌクレオチドを表す。図2は配列-1を含むDNA断片を示す。図3は組み換えDNA、pBShucep14の構築を示す。図4は遺伝子hucep-14の塩基配列決定の方法を示し、図5は遺伝子hucep-14の塩基配列及びそれによってコードされるアミノ酸配列を示す。図6は組み換えDNA、pCRhucep14の構築を示し、図7は組み換えDNA、pTrchucep14の構築を示し、図8は組み換えDNA、pREhucep14の構築を示す。

本発明を実施するための最良の形態

遺伝子hucep-14は、ヒト脳皮質由来のcDNAライブラリーから、該遺伝子を含んだcDNA断片として単離することができる。本発明者らが使用したcDNAライブラリーは、クローンテック社から市販されているヒト脳皮質のmRNAをもとに調製したものであるが、ストラタジーン社から市販されているヒト脳皮質のmRNAをもとにしても、同様にcDNAを調製することができる。

上述のcDNAライブラリーにおいて、ヒト脳組織で特異的に発現している遺伝子を有すると思われるcDNAを識別する方法として、大久保らの方法(Okubo et al., Nature Genet., 2, 173 (1992))による、遺伝子発現の出現頻度を解析する方法を用いることができる。具体的には、ヒト脳皮質のmRNAを鋳型とし、適当な制限酵素で開環させたベクタープラスミドの一端にオリゴdTを結合させたものをプライマーとしてcDNA合成を行った後、制限酵素MboIと制限酵素BamHIで切断する。当該ベクターはdamメチラーゼ陽性の大腸菌を宿主として調製されたため、MboIの認識配列である「G

ATC」のA残基がメチル化されている。従ってMbo Iは新たに合成されたcDNA部分のみを切断する。当該ベクターはオリゴdTを結合させた末端とは反対側の末端近傍にBamHI切断部位を1ヶ所だけ有しているので本酵素は当該ベクターを1ヶ所切断し、さらに新たに合成されたcDNA部分にもしBamHI認識配列が存在すれば、その部位も切断する。BamHIとMbo Iは「GATC」なる配列からなる、同一の付着端を生ぜしめるため、両酵素で切断した後、DNAリガーゼを作用させれば、プラスミドを閉環することができる。

本方法においてはこのようにして調製したプラスミドを用いて大腸菌を形質転換することによってcDNAライブラリーを構築した。従って当該ライブラリーは各mRNAの3' 端のポリA部位から、その5' 側部分のうち最初にGATCなる塩基配列が出現する部位までの領域を含んでいる。当該cDNAライブラリーから無作為に適当個数の組換え体を選択し、各組換え体中のcDNAを抽出してその全塩基配列を決定する。本法は、このようにして決定された特定配列を有するcDNA断片が、無作為に選択された組み換え体の中から幾つ確認されるかをもって、臓器特異的遺伝子及び高発現遺伝子を識別する方法である。本法において、組み換え体cDNAの抽出並びにcDNAの塩基配列の決定は、いずれも当業者にとって自体公知の各種操作方法(Molecular Cloning、2nd. ed., Cold Spring Harbor Lab. Press、1989、その他当業者にとって標準的な方法を紹介した技術解説書等に記載の方法、以下常法とする)により行うことができる。

尚、高発現遺伝子を識別する方法では、無作為に選択する組み換え体の総数は数百から千程度が適当であるが、必要ならばそれ以上の個数の組み換え体を処理すればよい。本発明者らは上記方法を実施し、770個の組み換え体中のcDNA断片の塩基配列を全て決定し、その中から、同一の配列を有するcDNAとしての出現頻度が2/770以上であったcDN

A断片を、ヒト脳で特異的に発現している遺伝子を有するDNA断片の候補として選別した。

上記cDNA断片は前述したとおり、mRNAの3'端の一部の領域しか含んでいない。そこで本発明者らは当該領域（以下3'断片）の塩基配列情報を元にして、全鎖長cDNAを取得した。

これは上記3'断片をプローブとして、クローンテック社から市販されているヒト大脳皮質cDNAライブラリーをブラークハイブリダイゼーションで、常法に従ってスクリーニングすることによって行った。その結果、約2.0kbのDNA断片を取得することができた。この際、ライブラリーとしてはストラタジーン社から市販されているヒト大脳皮質cDNAライブラリーを用いることもできる。

上記方法によって取得したクローンを大腸菌を宿主とすることによって増殖せしめ、常法に従ってラムダファージ粒子を調製した。当該ファージ粒子からDNAを抽出して、制限酵素EcoRIで切断し、ストラタジーン社から市販されているベクター、pBluescriptSKを同様にEcoRIで切断したものに組み込んで、全塩基配列を決定した。これらの操作は全て常法に従った。

上記方法によって選別したcDNA断片中に存在すると思われる遺伝子が、脳組織で特異的に発現していることの確認は、該cDNA配列の臓器特異的な発現頻度をノーザンハイブリダイゼーションで確認することで行うことができる。具体的には、クローンテック社又はストラタジーン社から市販されている、ヒトの各臓器から抽出したmRNAをアガロースゲル電気泳動で分画し、メンブレンフィルターに転写した後、上記方法によって選別したcDNA断片をプローブとして、常法に従ってハイブリダイゼーションを行った。本発明者らはこの方法を用い、該cDNA配列の発現についての臓器特異性を調べた。その結果、脳以外の他の臓器、器官、細胞等でも該cDNA配列の多少の発現が認められたものの、それに比べ大

脳皮質で特異的に発現していたことを確認した。

このことは、該 cDNA 配列中に、ヒト脳で特異的に発現し正常な脳機能の維持に必須である所望の遺伝子が存在することを、強く示唆するものである。

塩基配列中の蛋白質をコードする領域 (ORF, open reading frame) の存在は、塩基配列をコンピュータプログラムを用いて解析する汎用の方法により確認することができる。該 cDNA 配列の中に目的とする遺伝子の存在を確信した本発明者らは、コンピュータを利用して該配列中に ORF を見だし、この遺伝子を遺伝子 *hucp-14* (human cerebral protein の略)、該遺伝子にコードされる蛋白質を *HUCEP-14* と命名した。

遺伝子 *hucp-14* は、配列番号: 2 に示される 801 塩基対 (bp) からなる遺伝子である。この遺伝子 *hucp-14* を用い、適当な宿主ベクター系による一般的な遺伝子組み換え技術によって、組み換え遺伝子を調製することができる。適当なベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド (例、pBR322、pUC118 その他)、枯草菌由来のプラスミド (例、pUB110、pC194 その他)、酵母由来のプラスミド (例、pSH19 その他)、さらにバクテリオファージやレトロウィルスやワクシニアウィルス等の動物ウィルス等が利用できる。組み換えに際しては、適当な合成 DNA アダプターを用いて翻訳開始コドンや翻訳終止コドンを付加することも可能である。さらに該遺伝子を発現させるために、遺伝子の上流に適当な発現プロモーターを接続する。使用するプロモーターは、宿主に応じて適宜選択すればよい。例えば、宿主が大腸菌である場合には、T7 プロモーター、*lac* プロモーター、*trp* プロモーター、 λ PL プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合には SPO 系プロモーター等が、宿主が酵母である場合には PHO5 プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーター等が、宿主が動物細胞である場合

にはSV40由来プロモーター、レトロウィルスプロモーター等が、それぞれ使用できる。

また該遺伝子を他の蛋白質（例、グルタチオンSトランスフェラーゼ、プロテインAその他）との融合蛋白質として発現させることも可能である。このようにして発現させた融合型HUCEP-14は、適当なプロテアーゼ（例、トロンピン、エンテロキナーゼその他）を用いて切り出すことが可能である。

HUCEP-14の発現の際に利用できる宿主としては、エシェリヒア属菌であるEscherichia coliの各種菌株、バチルス属菌であるBacillus subtilisの各種菌株、酵母としてはSaccharomyces cerevisiaeの各種菌株、動物細胞としてはCOS-7細胞、CHO細胞、PC12細胞等が利用できる。

上記組み換えベクターを用いて宿主細胞を形質転換する方法としては、常法又は各宿主細胞に対して一般に用いられる形質転換方法が適用できる。

本発明者らは、pTrcHis（インビトロジェン社製）を発現ベクターとして遺伝子hucep-14を組み換え、HUCEP-14発現ベクター、pTrchucep14を調製した。

更に本発明者らは、pREP10（インビトロジェン社製）を発現ベクターとして遺伝子hucep-14を組み換え、HUCEP-14を培養動物細胞内で発現させるためのベクター、pREhucep14を調製した。このpREhucep14を用い、ギブコ社のLIPOFECTAMINE試薬を利用して、神経細胞PC12を形質転換し、形質転換体、PC12/pREhucep14を調製した。形質転換された細胞は、用いたベクターに存在する選択マーカー、又は適当な選択マーカーを付与又は削除し、これら選択マーカーの有無に基づいて識別することにより、単離する事ができる。本発明者らが行った、PC12細胞をpREhucep14で形質転換した場合には、抗生物質ハイグロマイシンB耐性を指標と

して形質転換体を識別、単離することができる。

上記操作の結果得られた形質転換細胞内での目的遺伝子の発現は、実施例において後述するように、ノーザンハイブリダイゼーションにより確認することができる。宿主として用いたPC12細胞およびベクターであるpREP10を導入したPC12細胞を通常の増殖培地から血清を除去した培地に移すと細胞死を起こすが、pREhucp14により形質転換されたPC12は、血清除去培地でも生育することが、例えばMTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) 法 (Mossman, T., J. Immunol Methods 65, 55-59 (1985)) により確認された。

新規蛋白質HUCEP-14は、配列番号：1に示されるごとく、総数267個のアミノ酸残基からなる、分子量30254ダルトンの蛋白質である。前述のように、遺伝子hucp-14を含有する組み換えベクターで形質転換させた神経細胞PC12が、血清の非存在下において有意に高い生存率を示したことから、HUCEP-14は神経細胞機能賦活化活性を有する生理活性蛋白質であることが確認された。

尚、本発明においては、配列番号：2に示したDNA配列の他に、該DNAとハイブリダイズしかつ神経細胞機能賦活化活性を有する生理活性蛋白質をコードするDNAも、本発明の範囲内である。

すなわち、遺伝子hucp-14の全長配列において、種々の人為的処理、例えば部位特異的変異導入、変異剤処理によるランダム変異、制限酵素切断によるDNA断片の変異・欠失・連結等により、部分的にDNA配列が変化したものであっても、これらDNA変異体が遺伝子hucp-14とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ神経細胞機能賦活化活性を有する生理活性蛋白質をコードするDNAであれば、配列表2に示したDNA配列との相違に関わらず、本発明の範囲内のものであ

る。

また、配列番号：2に示したDNA配列と僅かに異なる配列からなる遺伝子が、ヒト染色体上に遺伝子huc ep-14とは別個に存在する可能性もあり得るが、この場合においても、そこにコードされる蛋白質が神経細胞機能賦活化活性を有する生理活性蛋白質であれば、上記人為的変異体と同様に本発明の範囲内のものである。

上記のDNA変異の程度は、遺伝子huc ep-14のDNA配列と90%以上の相同性を有するものであれば許容範囲内である。また、遺伝子huc ep-14とハイブリダイズする程度としては、通常の条件下（例えばDIG DNA Labeling kit（ベーリンガー・マンハイム社製 Cat No. 1175033）でプローブをラベルした場合に、32℃のDIG Easy Hyb溶液（ベーリンガー・マンハイム社製 Cat No. 1603558）中でハイブリダイズさせ、50℃の0.5xSSC溶液（0.1% [w/v] SDSを含む）中でメンブレンを洗浄する条件（1xSSCは0.15M NaCl、0.015M クエン酸ナトリウムである）でのサザンハイブリダイゼーションで、遺伝子huc ep-14にハイブリダイズする程度であればよい。

また、上記のごとく遺伝子huc ep-14と相同性の高い変異体遺伝子にコードされる蛋白質であって、神経細胞機能賦活化活性を有する生理活性蛋白質もまた、本発明の範囲内のものである。

すなわち、新規蛋白質HUC EP-14のアミノ酸配列の1もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加された変異体であっても、該変異体が神経細胞機能賦活化活性を有する蛋白質であれば、該変異体は本発明の範囲内のものである。

蛋白質の構成要素となるアミノ酸の側鎖は、疎水性、電荷、大きさなどにおいてそれぞれ異なるものであるが、実質的に蛋白質全体の3次元構造（立体構造とも言う）に影響を与えないという意味で保存性の高い幾つか

の関係が、経験的にまた物理化学的な実測により知られている。例えば、アミノ酸残基の置換については、グリシン (Gly) とプロリン (Pro)、Gly とアラニン (Ala) 又はバリン (Val)、ロイシン (Leu) とイソロイシン (Ile)、グルタミン酸 (Glu) とグルタミン (Gln)、アスパラギン酸 (Asp) とアスパラギン (Asn)、システイン (Cys) とスレオニン (Thr)、Thr とセリン (Ser) 又は Ala、リジン (Lys) とアルギニン (Arg)、等が挙げられる。

従って、配列番号：1 に示した新規蛋白質 HUCEP-14 のアミノ酸配列上の置換、挿入、欠失等による変異蛋白質であっても、その変異が HUCEP-14 蛋白質の 3 次元構造において保存性が高い変異であって、その変異蛋白質が HUCEP-14 と同様に神経細胞機能賦活化活性を有する生理活性蛋白質であれば、これらは本発明の範囲内にあるものと言うことができる。変異の程度としては、配列番号：1 に示したアミノ酸配列との相同性が、90% 以上のものが許容し得る範囲である。

産業上の利用可能性

HUCEP-14 が神経細胞賦活化活性を有していることから、遺伝子 *hucep-14* の発現異常、あるいは HUCEP-14 の機能不全は、脳の高次機能を維持する上で重大な障害となると推測される。

したがって、HUCEP-14 それ自体は虚血性脳疾患やアルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患の治療薬として有用と考えられる。また、当該蛋白質の機能と同様の機能を有する物質、当該機能を増強する物質、あるいはまた当該遺伝子の発現を促進する物質等の創出に利用することができる。

以下実施例を挙げて詳述するが、本発明はこの実施例に限定されないことは言うまでもない。

実施例1 遺伝子hucp-14のクローニング

1) 脳の正常機能の維持に必要な遺伝子の部分配列の決定

ヒト大脳皮質のmRNA（クローンテック社）を鋳型として、大久保らの方法（Okubo et al. Nature Genet., 1992, 2, p173）により、大脳皮質のcDNAライブラリーを作成した。

次いで、当該ライブラリーから無作為に770個の組換え体を選択し、常法（Molecular Cloning, 2nd. ed., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989、以下同じ）に従って、組換えDNAを抽出し、cDNA部分の3'側の塩基配列を決定した。配列決定にはPEアプライドバイオシステムズ社製のDNAシーケンサー（ABI PRISM377）と同社製反応キットを用いた。

770個の組み換え体中の各DNA断片の発現頻度を解析した結果、図1に示す配列（配列-1）を有する遺伝子の発現頻度が2/770であった。

2) 配列-1を含むcDNA断片のクローニング

配列-1を含むcDNA断片のクローニングを以下の方法により行った。

まず、配列-1の一部よりなるオリゴヌクレオチド（図1；配列-2）を、PEアプライドバイオシステムズ社製のDNA合成機（ABI 380B）で合成した。λgt11をクローニングベクターとする、Human Brain cerebral cortex 5'-STRETCH cDNA library（クローンテックラボラトリーズ社製）を、大腸菌K12株、Y1090を宿主として常法に従ってプラークを形成せしめた。プラークをメンブレンフィルター（アマシャム社製Hybond-N+）に転写し、DIG（ジゴキシゲニン）で標識した配列-2のオリゴヌクレオチドをプローブとして、プラークハイブリダイゼーション法によって配列-2を有するファージを取得した。標識にはDIGオリゴヌク

レオチド・テイリングキット（ベーリンガーマンハイム社製）を使用し、方法は本キットの手順に従った。ハイブリダイゼーションは以下の組成の溶液中で（濃度は全て終濃度）、51℃で5時間行った。

5xSSC

1% Blocking Buffer

0.1% N-ラウロイルサルコシルナトリウム

0.02% SDS

50 μ g/ml polyA

1pmol/ml DIG 標識合成DNA

ハイブリダイゼーション終了後、メンブレンを2xSSC、0.1%SDS、次いで0.5xSSC、0.1%SDSを用い、51℃で洗浄した。メンブレン洗浄後、DIG発光検出キット（ベーリンガーマンハイム社製）を使用し、当該キットの手順に従ってメンブレンを処理した。シグナルの検出には、Hyperfilm™-ECL（アマシャム社製）フィルムを使用した。

プローブとハイブリダイズしたプラークを常法に従って純化し、単一クローンを取得した。

当該単一クローンを増殖せしめ、ファージ粒子よりDNAを抽出、精製した。これらの操作は全て常法に従った。

3) 塩基配列決定用ベクターへのサブクローニング

2) で精製したDNAを、制限酵素、EcoRIで切断し、同様にEcoRIで切断したベクター、pBluescriptSK（ストラタジーン社製）にサブクローニングした。Ligation溶液は、宝酒造（株）製のキット（タカラ DNA Ligation Kit Ver. 2）を用い、16℃で1.5時間反応させた。

上記反応溶液を用いて常法に従って大腸菌K12株DH5の形質転換を行った。

形質転換体をアンピシリン (Amp) $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal) $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、Isopropyl- β -D-Thio-Galactopyranoside (IPTG) $100 \mu\text{M}$ を含むLB寒天培地にプレーティングし、 37°C で一晩培養した。

白色コロニーを $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のAmpを含むLB液体培地 10 ml に接種して 37°C で一晩培養し、遠心分離によって菌体を集めた後、QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit (キアゲン社製)で組換えDNAを精製した。このようにして構築した組換えDNAをpBShucep14と命名した(図3)。

4) DNA断片の塩基配列の決定

塩基配列決定にはPEアプライドバイオシステムズ社製のDNAシーケンサーを用い、ダイターミネーター法を用いた。決定された塩基配列を元にしてオリゴヌクレオチドを合成し、プライマーウオーキング法で全塩基配列を決定した(図4)。両鎖の塩基配列を決定した。当該クローンのcDNAの全塩基配列を図5に示した。当該塩基配列が配列-2を含んでいたことから、目的とする遺伝子(human cerebral protein-14、hucep-14)がクローニングされたことを確認した。

当該cDNAは267残基より成る蛋白質(HUCEP-14)をコードする翻訳領域(open reading frame、ORF)を含んでいる(図5)。

5) 大腸菌を用いたHUCEP-14の生産

図5に示した配列を元にして配列-3、配列-4のオリゴヌクレオチドを、DNA合成機(PEアプライドバイオシステムズ社製、ABI 380B)で合成した。

配列-3

5' CCGGCGCAGCCATGGTGAAGATTAGC

配列 - 4

5' CTCACACCACCCCGCAGATGAGCGTC

実施例 1 - 2) で調製した組換え DNA、pBShucep14 を鋳型とし、配列 - 3 と配列 - 4 のオリゴヌクレオチドをプライマーとして以下の反応条件で PCR を行った。当該反応にはストラタジーン社製の Pfu DNA ポリメラーゼを用い、宝酒造 (株) 製の PCR サーマルサイクラー MP を使用した。

反応組成液

pBShucep14 (1 μ g/ml)	1 μ l
10 \times PCR 緩衝液	5 μ l
2.5mM dNTP	8 μ l
10 μ M オリゴヌクレオチド (配列-3)	2 μ l
10 μ M オリゴヌクレオチド (配列-4)	2 μ l
水	31 μ l
Pfu DNA ポリメラーゼ	1 μ l
総量	50 μ l

反応条件

94 $^{\circ}$ C で 1 分保持後、53 $^{\circ}$ C まで -1 $^{\circ}$ C/2 秒の速度で冷却し、53 $^{\circ}$ C で 1 分間保持し、更に 72 $^{\circ}$ C で 3 分間保持した。これを 30 回繰り返した後、72 $^{\circ}$ C で 10 分間保持して目的配列を増幅させた。

上記方法により増幅された DNA 断片をアガロースゲル電気泳動で分画し、約 0.8 kb の DNA 断片を精製した (断片 - 1)。断片 - 1 を、あらかじめ開環したベクター、pCR-Blunt (インビトロジェン社製) と混合し、実施例 1 - 3) に記載した条件下で、ライゲーションならびに大腸菌 K12 株 DH5 株の形質転換を行い、さらに該形質転換体を培養し

て遠心によって集めた菌体から、組換えDNAを精製した。当該組換えDNAに挿入された断片-1の塩基配列を、以下に示す配列-5及び配列-6のプライマー、及び実施例1-4)で塩基配列を決定する際に用いたプライマーを利用し、DNAシーケンサーで決定した。

配列-5

5' CACAGGAAACAGCTATGACC

配列-6

5' ATACGACTCACTATAGGGCG

その結果、当該断片-1の塩基配列がhuc ep-14の塩基配列と同一であることを確認した。このようにして構築した組換えDNAのうち、HUC EP-14の開始コドンがpCR-B luntのBamH I切断部位側に位置し、終始コドンがXho I切断部位側に位置するように断片-1が挿入された組換えDNAをpCRhuc ep14と命名した(図6)。当該組換えDNAを保持する菌体を培養して遠心によって集めた菌体から組換えDNAを精製し、制限酵素BamH IとXho I(共に宝酒造製)で切断した。切断処理後、アガロースゲル電気泳動で分画し、約0.8 kbのDNA断片を精製した(断片-2)。蛋白質生産用ベクター、pTrcHisA(インビトロジェン社製)を、上記と同様に制限酵素BamH IとXho Iで切断し、開環ベクター(断片-3)を精製した。断片-2と断片-3を混合し、実施例1-3)に記載した条件下で、ライゲーションならびに大腸菌K12株DH5株の形質転換を行い、さらに該形質転換体を培養して遠心によって集めた菌体から、組換えDNAを精製した。このようにして構築した組換えDNAをpTrchuc ep14と命名した(図7)。当該組換えDNAを保持する菌体を培養し、IPTGを終濃度0.1~1mMになるように培養液に添加することによって遺伝子発現を誘導すれば、HUC EP-14を、そのN端側にエンテロキナーゼ切断部位を有するオリゴペプチドと、さらにその上流に6個のヒスチジン残基

が結合した融合蛋白として生産することができる。

実施例2 PC12細胞中でのhucp-14遺伝子の発現と機能の解析

1) 発現ベクターpREhucp14の構築

動物細胞の発現ベクター、pREP10（インビトロジェン社製）を、制限酵素BamHIとXhoI（共に宝酒造製）で切断し、開環ベクター（断片-4）を精製した。

実施例1で精製した断片-2と断片-4を混合し、実施例1に記載した条件下で、ライゲーションならびに大腸菌K12株DH5株の形質転換を行い、さらに該形質転換体を培養して遠心によって集めた菌体から、組換えDNAを精製した。このようにして構築した組換えDNAをpREhucp14と命名した（図8）。

2) PC12細胞への導入と安定な形質転換体の取得

PC12細胞を直径60mmのプラスチックシャーレで培養した。シャーレはコラーゲンコートしたものを扱い、培地としては5%牛胎児血清、5%ウマ血清、50ユニット/mlペニシリン、50 μ g/mlストレプトマイシンを含むDMEM（ギブコ社製、以下増殖培地とする）を使用し、37℃、5%CO₂存在下で培養した。

細胞密度が50%になった時点で、1)で構築したpREhucp14を含むLIPOFECTAMINE試薬（ギブコ社製）を、細胞上に重層して24時間培養した後、増殖培地に置換して24時間培養した。ピペティングで細胞を分散した後、細胞懸濁液を2等分して直径100mmのプラスチックシャーレ2枚に分注してさらに24時間培養した。

培地を除いた後、ハイグロマイシンB（カルピオケム社製；終濃度40 μ g/ml）を含有する増殖培地に置換した。ハイグロマイシンB添加培地を3日毎に交換してして2週間培養した。細胞のコロニーが肉眼で確認できるようになった時点で、ステンレスカップを用いてコロニーを5個

単離した。対照として用いるためにPC12細胞にpREP10のみを上記と同様にして導入し、安定な形質転換体を5個単離した。

3) 遺伝子発現の確認

単離した各形質転換体を、24穴のプレートでハイグロマイシンB添加培地（終濃度400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）で培養し、細胞密度が80%コンフルエントになった時点でピペティングで細胞を分散して、直径100mmのプラスチックシャーレに接種した。細胞密度が再度80%コンフルエントになった時点で培地を除去し、PBSを添加してセルスクレイパーを用いて細胞を回収した。遠心によって細胞を沈殿させた後に上清を除去し、mRNA抽出キット（ファルマシア バイオテク社製）を用いて細胞からmRNAを精製した。2 μg のmRNAを定法に従ってアガロースゲル電気泳動で分画してメンブレン（アマシャム社製Hybond-N+）に転写し、ノーザンハイブリダイゼーションを行った。プローブとしてはDIG（ジゴキシゲニン）で標識したhucp-14のcDNA断片を用いた。標識にはDIGオリゴヌクレオチド・テイリングキット（ベーリンガーマンハイム社製）を使用し、方法は本キットの手順に従った。ハイブリダイゼーションは以下の組成の溶液中で（濃度は全て終濃度）、51℃で5時間行った。

5xSSC

1% Blocking Buffer

0.1% N-ラウロイルサルコシレート

0.02% SDS

50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ polyA

1pmol/ml DIG 標識合成DNA

ハイブリダイゼーション終了後、メンブレンを2xSSC、0.1%SDS、次いで0.5xSSC、0.1%SDSを用い、51℃で洗浄した。

メンブレン洗浄後、DIG発光検出キット（ベーリンガーマンハイム社

製)を使用し、当該キットの手順に従ってメンブレンを処理した。シグナルの検出には、Hyperfilm™-ECL (アマシャム社製)フィルムを使用した。

その結果、pREhucp14を導入したPC12細胞のほうがpREP10を導入したPC12細胞よりも、hucp-14遺伝子の発現量が多かった。

請求の範囲

1. 以下の (a) 又は (b) の蛋白質 ;
 - (a) 配列番号 : 1 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質 ;
 - (b) 配列番号 : 1 のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ神経細胞機能賦活化活性を有する蛋白質。
2. 請求の範囲 1 に記載の (a) 又は (b) の蛋白質をコードする遺伝子。
3. 以下の (a) 又は (b) からなる遺伝子 ;
 - (a) 配列番号 : 2 に記載の塩基配列からなる DNA ;
 - (b) 配列番号 : 2 の DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ神経細胞機能賦活化活性を有する蛋白質をコードするヒト由来の DNA。
4. 請求の範囲 2 又は 3 に記載の遺伝子を含有する組み換えベクターを含む形質転換体。

1 / 1 2

図 1

配列 - 1

GATCTCTTTT CAGAAGTGTC TATAGAACAA TAAAAATCTT TNACTTCTGA 50
CCTTGAAA 58

配列 - 2

5' GATCTCTTTTCAGAAGTGTCATAGAACAATAAAAAATCTT

2 / 1 2

☒ 2

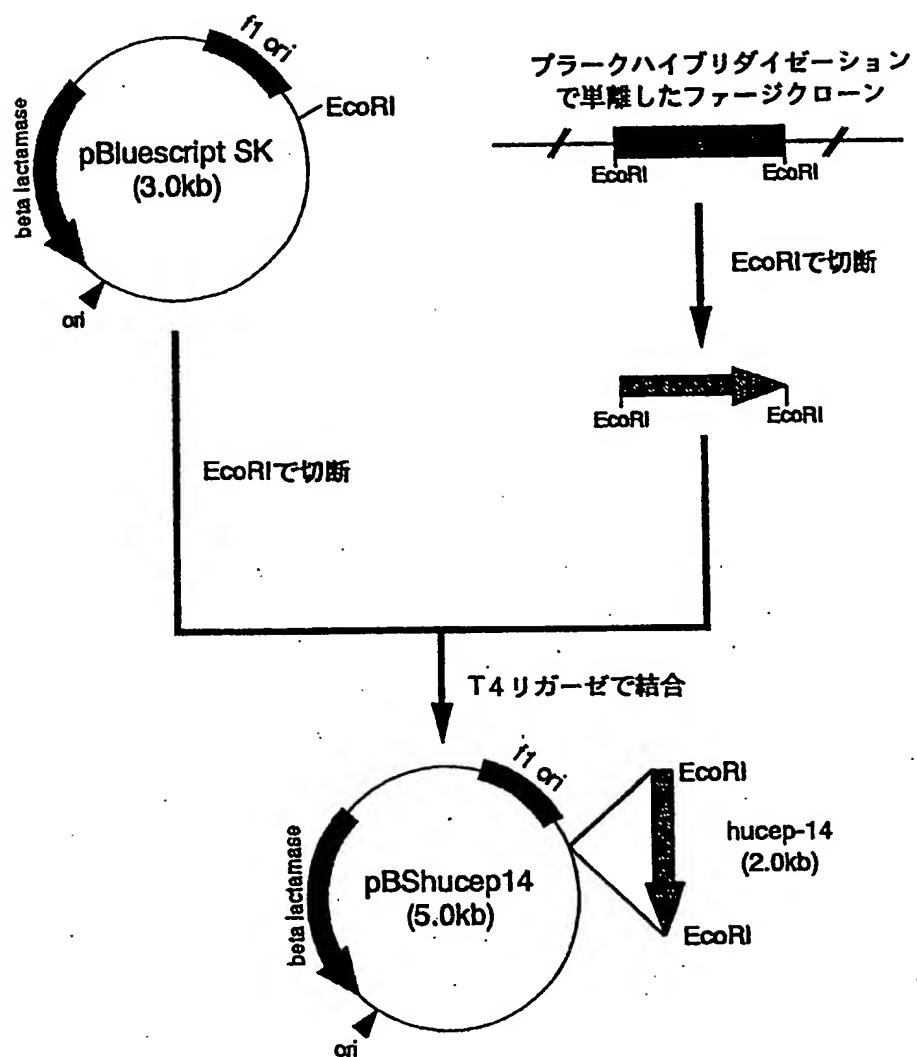
GCGGGAGGCAGAGACCGAGGCTGCRCCGGCAGAGGCTGCGGGGCGGACGC
GCGGGCCGGCGCAGCCATGGTGAAGATTAGCTTCCAGCCCGCCGTGGCTG
GCATCAAGGGCGACAAGGCTGACAAGGCGTCGGCGTCGGCCCCTGCGCCG
GCCTCGGCCACCGAGATCCTGCTGACGCCGGCTAGGGAGGAGCAGCCCCC
ACAACATCGATCCAAGAGGGGGAGCTCAGTGGGCGGCGTGTGCTACCTGT
CGATGGGCATGGTCGTGCTGCTCATGGGCCCTCGTGTTGCGCTCTGTCTAC
ATCTACAGATACTTCTTTCTTGACAGCTGGCCCGAGATAACTTCTTCCG
CTGTGGTGTGCTGTATGAGGACTCCCTGTCCTCCCAGGTCCGGACTCAGA
TGGAGCTGGAAGAGGATGTGAAAATCTACCTCGACGAGAACTACGAGCGC
ATCAACGTGCCTGTGCCCCAGTTTGGCGGCGGTGACCCTGCAGACATCAT
CCATGACTTCCAGCGGGGTCTGACTGCGTACCATGATATCTCCCTGGACA
AGTGCTATGTCATCGAACTCAACACCACCATTGTGCTGCCCCCTCGCAAC
TTCTGGGAGCTCCTCATGAACGTGAAGAGGGGGACCTACCTGCCGCAGAC
GTACATCATCCAGGAGGAGATGGTGGTCACGGAGCATGTCAGTGACAAGG
AGGCCCTGGGGTCCTTCATCTACCACCTGTGCAACGGGAAAGACACCTAC
CGGCTCCGGCGCCGGGCAACGCGGAGGCGGATCAACAAGCGTGGGGCCAA
GAACTGCAATGCCATCCGCCACTTCGAGAACACCTTCGTGGTGGAGACGC
TCATCTGCGGGGTGGTGTGAGGCCCTCCTCCCCAGAACCCCTGCCGTG
TTCTCTTTTTCTTCTTTCCGGCTGCTCTCTGGCCCTCCTCCTTCCCCCTG
CTTAGCTTGTACTTTGGACGCGTTTCTATAGAGGTGACATGTCTCTCCAT
TCCTCTCCAACCCTGCCACCTCCCTGTACCAGAGCTGTGATCTCTCGGT
GGGGGGCCCATCTCTGCTGACCTGGGTGTGGCGGAGGGAGAGGCGATGCT
GCAAAGTGTTTTCTGTGTCCCACTGTCTTGAAGCTGGGCCTGCCAAAGCC

3 / 1 2

TGGGCCCACAGCTGCACCGGCAGCCCAAGGGGAAGGACCGGTTGGGGGAG
CCGGGCATGTGAGGCCCTGGGCAAGGGGATGGGGCTGTGGGGGCGGGGCG
GCATGGGCTTCAGAAGTATCTGCACAATTAGAAAAGTCCTCAGAAGCTTT
TTCTTGGAGGGTACACTTTCTTCACTGTCCCTATTCCTAGACCTGGGGCT
TGAGCTGAGGATGGGACGATGTGCCCAGGGAGGGACCCACCAGAGCACAA
GAGAAGGTGGCTACCTGGGGGTGTCCCAGGGACTCTGTCAGTGCCTTCAG
CCCACCAGCAGGAGCTTGGAGTTTGGGGAGTGGGGATGAGTCCGTCAAGC
ACAACTGTTCTCTGAGTGGAACCAAAGAAGCAAGGAGCTAGGACCCCCAG
TCCTGCCCCCAGGAGCACAAGCAGGGTCCCCTCAGTCAAGGCAGTGGGA
TGGGCGGCTGAGGAACGGGGCAGGCAAGGTCACTGCTCAGTCACGTCCAC
GGGGGACGAGCCGTGGGTTCTGCTGAGTAGGTGGAGCTCATTGCTTTCTC
CAAGCTTGGAAGTGTGTTTGAAGATAACACAGAGGGAAAGGGAGAGCCAC
CTGGTACTTGTCCACCCTGCCTCCTCTGTTCTGAAATTCCATCCCCCTCA
GCTTAGGGGAATGCACCTTTTTCCCTTCTCACTTTTGCATGTTTT
TACTGATCATTCGATATGCTAACCGTTCTCAGCCCTGAGCCTTGGAGAGG
AGGGCTGTAACGCCTTCAGTCAGTCTCTGGGGATGAACTCTTAAATGCT
TTGTATATTTTCTCAATTAGATCTCTTTTCAGAAGTGTCTATAGAACAAT
AAAAATCTTTTACTCCG

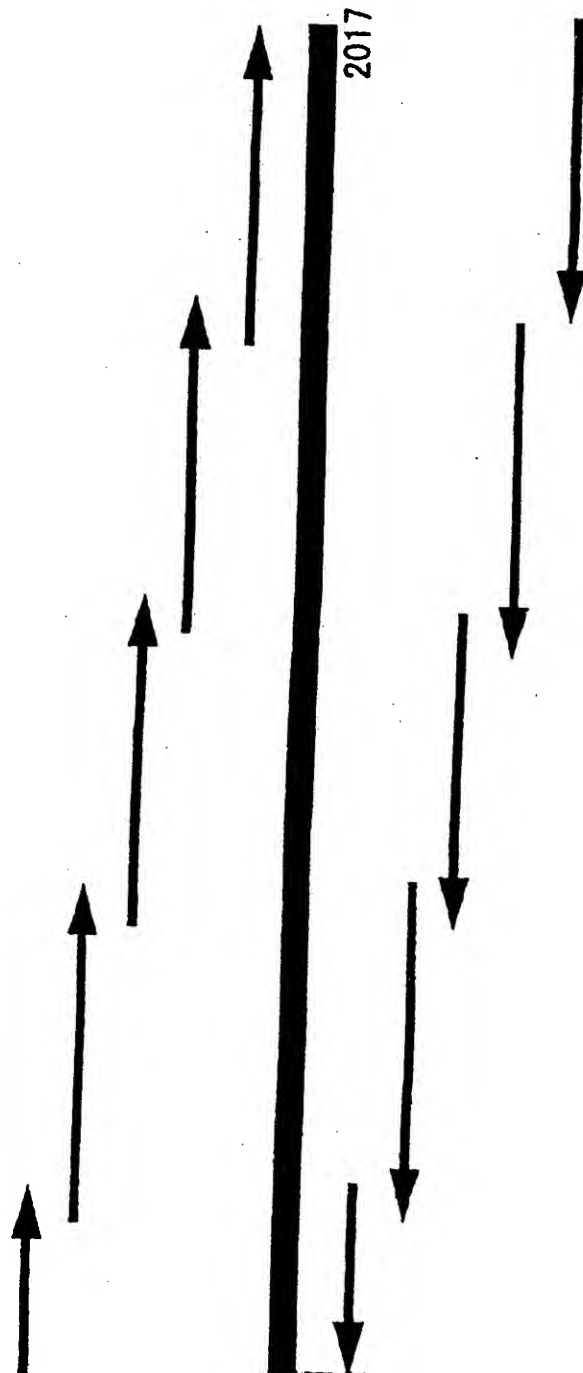
4 / 1 2

図 3



5 / 1 2

4



6 1 2

図 5

GCGGGAGGCAGAGACCGAGGCTGCRCCGGCAGAGGCTGCGGGGCGGACGCGCGGGCCGGC
|-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60

GCAGCCATGGTGAAGATTAGCTTCCAGCCCGCCGTGGCTGGCATCAAGGGCGACAAGGCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
MetValLysIleSerPheGlnProAlaValAlaGlyIleLysGlyAspLysAla

GACAAGGCGTCGGCGTCGGCCCCCTGCGCCGGCCTCGGCCACCGAGATCCTGCTGACGCCG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
AspLysAlaSerAlaSerAlaProAlaProAlaSerAlaThrGluIleLeuLeuThrPro

GCTAGGGAGGAGCAGCCCCACAACATCGATCCAAGAGGGGAGCTCAGTGGGCGGGCTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
AlaArgGluGluGlnProProGlnHisArgSerLysArgGlySerSerValGlyGlyVal

TGCTACCTGTGCGATGGGCATGGTCGTGCTGCTCATGGGCCTCGTGTTCCGCTCTGTCTAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CysTyrLeuSerMetGlyMetValValLeuLeuMetGlyLeuValPheAlaSerValTyr

ATCTACAGATACTTCTTTCTTGCACAGCTGGCCCGAGATAACTTCTTCCGCTGTGGTGTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
IleTyrArgTyrPhePheLeuAlaGlnLeuAlaArgAspAsnPhePheArgCysGlyVal

CTGTATGAGGACTCCCTGTCCTCCCAGGTCCGGACTCAGATGGAGCTGGAAGAGGATGTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
LeuTyrGluAspSerLeuSerSerGlnValArgThrGlnMetGluLeuGluGluAspVal

AAAATCTACCTCGACGAGAACTACGAGCGCATCAACGTGCCTGTGCCCCAGTTTGGCGGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
LysIleTyrLeuAspGluAsnTyrGluArgIleAsnValProValProGlnPheGlyGly

(つづく)

7 / 1 2

図 5 の つ づ き (1)

GGTGACCCTGCAGACATCATCCATGACTTCCAGCGGGGTCTGACTGCGTACCATGATATC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
GlyAspProAlaAspIleIleHisAspPheGlnArgGlyLeuThrAlaTyrHisAspIle

TCCCTGGACAAGTGCTATGTCATCGAACTCAACACCACCATTGTGCTGCCCCCTCGCAAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
SerLeuAspLysCysTyrValIleGluLeuAsnThrThrIleValLeuProProArgAsn

TTCTGGGAGCTCCTCATGAACGTGAAGAGGGGGACCTACCTGCCGCAGACGTACATCATC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
PheTrpGluLeuLeuMetAsnValLysArgGlyThrTyrLeuProGlnThrTyrIleIle

CAGGAGGAGATGGTGGTCACGGAGCATGTCAGTGACAAGGAGGCCCTGGGGTCCTTCATC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
GlnGluGluMetValValThrGluHisValSerAspLysGluAlaLeuGlySerPheIle

TACCACCTGTGCAACGGGAAAGACACCTACCGGCTCCGGCGCCGGGCAACGCGGAGGCGG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
TyrHisLeuCysAsnGlyLysAspThrTyrArgLeuArgArgArgAlaThrArgArgArg

ATCAACAAGCGTGGGGCCAAGAACTGCAATGCCATCCGCCACTTCGAGAACACCTTCGTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
IleAsnLysArgGlyAlaLysAsnCysAsnAlaIleArgHisPheGluAsnThrPheVal

GTGGAGACGCTCATCTGCGGGGTGGTGTGAGGCCCTCCTCCCCCAGAACCCCTGCCGTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
ValGluThrLeuIleCysGlyValVal

(つ づ く)

8 / 1 2

図 5 のつづき (2)

```
TTCCTCTTTTCTTCTTTCCGGCTGCTCTCTGGCCCTCCTCCTTCCCCCTGCTTAGCTTGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960

ACTTTGGACGCGTTTCTATAGAGGTGACATGTCTCTCCATTCTCTCCAACCCTGCCCAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020

CTCCCTGTACCAGAGCTGTGATCTCTCGGTGGGGGGCCCATCTCTGCTGACCTGGGTGTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080

GCGGAGGGAGAGGCGATGCTGCAAAGTGT TTTCTGTGTCCCACTGTCTTGAAGCTGGGCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140

TGCCAAAGCCTGGGCCCCACAGCTGCACCGGCAGCCCAAGGGAAGGACCGGTTGGGGGAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200

CCGGGCATGTGAGGCCCTGGGCAAGGGGATGGGGCTGTGGGGGCGGGGCGGCATGGGCTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260

CAGAAGTATCTGCACAATTAGAAAAGTCCTCAGAAGCTTTTTCTTGGAGGGTACACTTTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320

TTCCTGTCCCTATTCCTAGACCTGGGGCTTGAGCTGAGGATGGGACGATGTGCCCAGGG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380

AGGGACCCACCAGAGCACAAAGAGAAGGTGGCTACCTGGGGGTGTCCAGGGACTCTGTCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440

GTGCCTTCAGCCCACCAGCAGGAGCTTGGAGTTTGGGGAGTGGGGATGAGTCCGTCAAGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
```

(つづく)

9 / 1 2

図 5 のつづき (3)

[illegible]

1 0 / 1 2

図 6

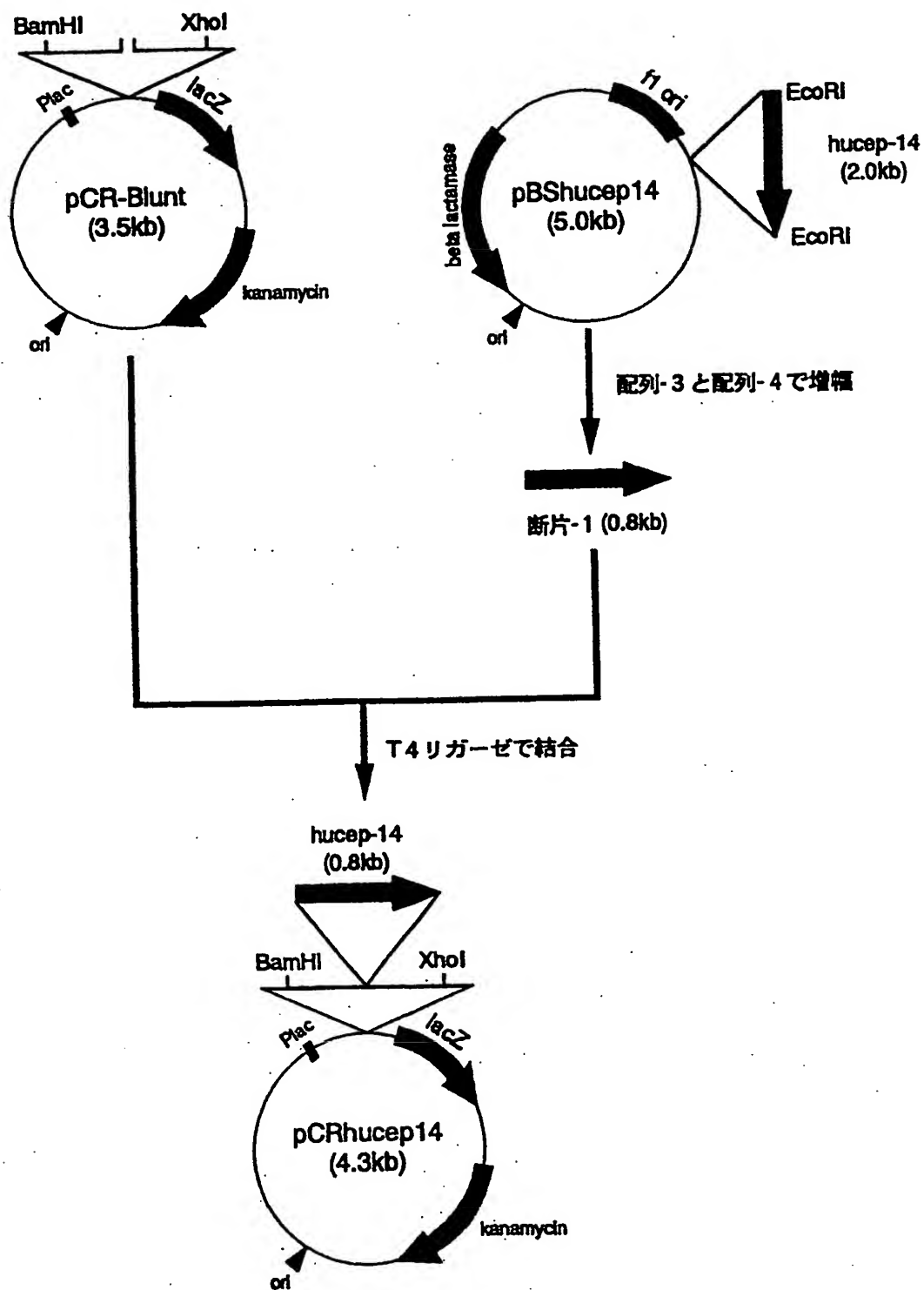
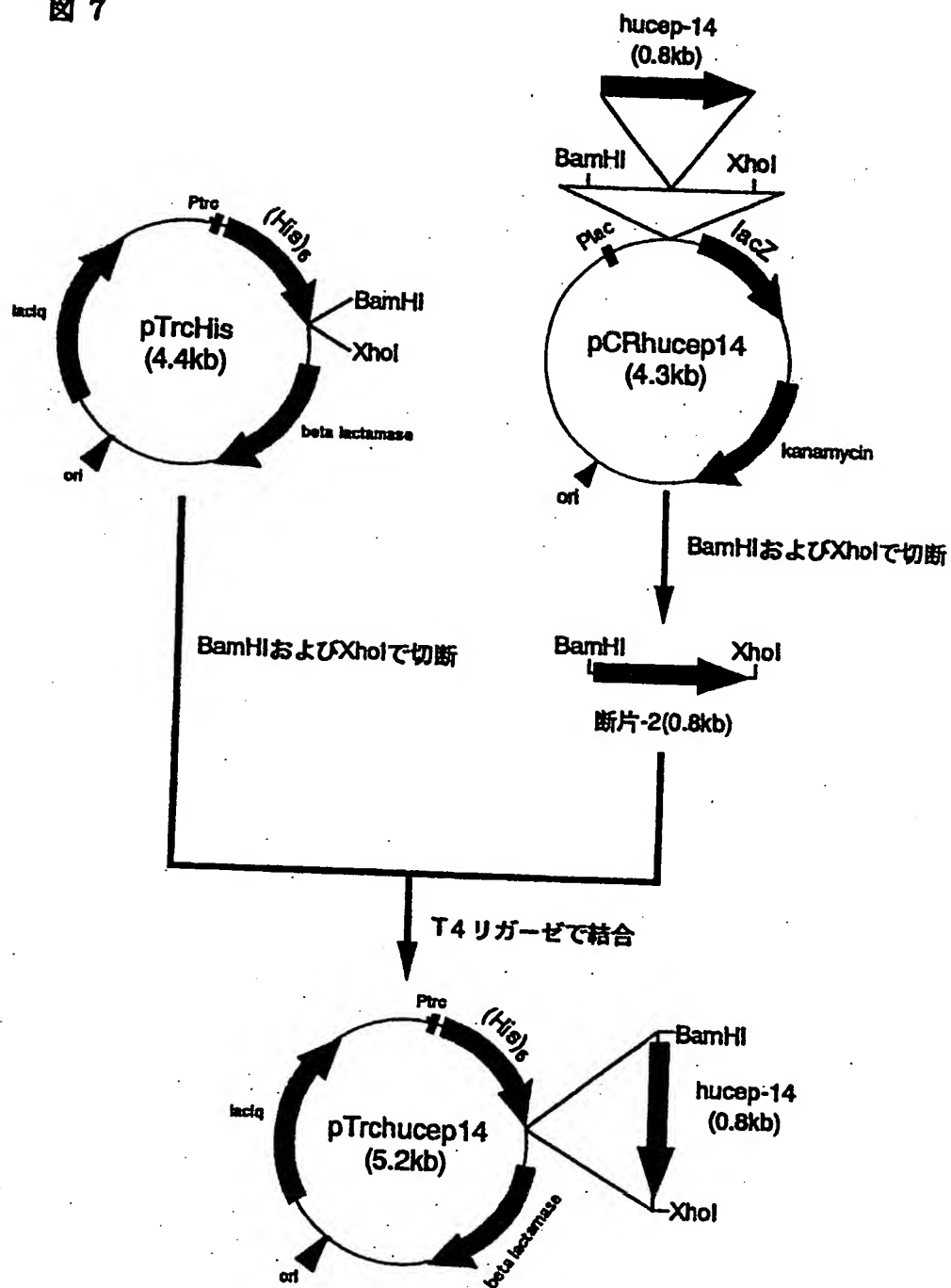
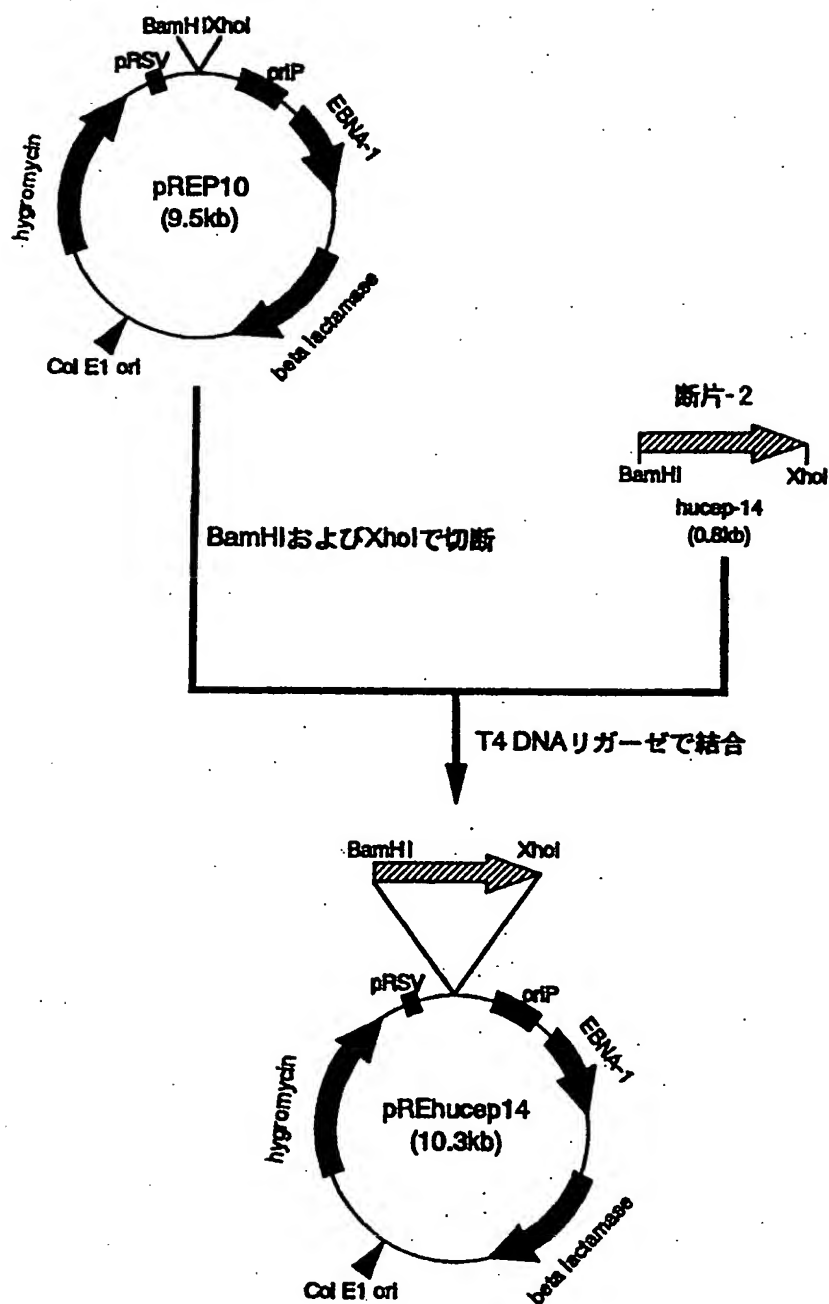


図 7



1 2 / 1 2

図 8



配列表

<110>Taisho Pharmaceutical Co., LTD

<120>Neuroprotective Protein

<130>P454

<140>PCT

<141>1998-9-7

<150>JP

<151>1997-9-8

<160>2

<210>1

<211>267

<212>PRT

<213>HUMAN

<400>

Met	Val	Lys	Ile	Ser	Phe	Gln	Pro	Ala	Val	Ala	Gly	Ile	Lys	Gly	Asp
1				5						10				15	
Lys	Ala	Asp	Lys	Ala	Ser	Ala	Ser	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Ser	Ala	Thr
			20					25						30	
Glu	Ile	Leu	Leu	Thr	Pro	Ala	Arg	Glu	Glu	Gln	Pro	Pro	Gln	His	Arg
			35				40						45		
Ser	Lys	Arg	Gly	Ser	Ser	Val	Gly	Gly	Val	Cys	Tyr	Leu	Ser	Met	Gly
		50				55				60					
Met	Val	Val	Leu	Leu	Met	Gly	Leu	Val	Phe	Ala	Ser	Val	Tyr	Ile	Tyr
		65			70				75					80	
Arg	Tyr	Phe	Phe	Leu	Ala	Gln	Leu	Ala	Arg	Asp	Asn	Phe	Phe	Arg	Cys
			85						90					95	
Gly	Val	Leu	Tyr	Glu	Asp	Ser	Leu	Ser	Ser	Gln	Val	Arg	Thr	Gln	Met

2/3

100	105	110	
Glu Leu Glu Glu Asp Val Lys Ile Tyr Leu Asp Glu Asn Tyr Glu Arg			
115	120	125	
Ile Asn Val Pro Val Pro Gln Phe Gly Gly Gly Asp Pro Ala Asp Ile			
130	135	140	
Ile His Asp Phe Gln Arg Gly Leu Thr Ala Tyr His Asp Ile Ser Leu			
145	150	155	160
Asp Lys Cys Tyr Val Ile Glu Leu Asn Thr Thr Ile Val Leu Pro Pro			
165	170	175	
Arg Asn Phe Trp Glu Leu Leu Met Asn Val Lys Arg Gly Thr Tyr Leu			
180	185	190	
Pro Gln Thr Tyr Ile Ile Gln Glu Glu Met Val Val Thr Glu His Val			
195	200	205	
Ser Asp Lys Glu Ala Leu Gly Ser Phe Ile Tyr His Leu Cys Asn Gly			
210	215	220	
Lys Asp Thr Tyr Arg Leu Arg Arg Arg Ala Thr Arg Arg Arg Ile Asn			
225	230	235	240
Lys Arg Gly Ala Lys Asn Cys Asn Ala Ile Arg His Phe Glu Asn Thr			
245	250	255	
Phe Val Val Glu Thr Leu Ile Cys Gly Val Val			
260	265		

<210>2

<211>801

<212>DNA

<213>HUMAN

<400>

```
atggatgaaga ttagcttcca gcccgccgtg gctggcatca agggcgacaa 50
ggctgacaag gcgtcggcgt cggccctgc gccggcctcg gccaccgaga 100
tccgtctgac gccggctagg gaggagcagc cccacaaca tcgatccaag 150
agggggagct cagtgggcgg cgtgtgttac ctgtcgatgg gcatggctgt 200
gctgtctatg ggctctgtgt tcgctctgt ctacatctac agatacttct 250
ttcttgaca gctggcccga gataacttct tccgtctgg tgtgtgttat 300
gaggactccc tgtcttccca ggtccggact cagatggagc tggaagagga 350
tgtgaaaatc tacctcgacg agaactacga gcgcatcaac gtgcctgtgc 400
cccagtttgg cggcgggtgac cctgcagaca tcatccatga cticcagcgg 450
ggcttgactg cgtacatga tatctcccig gacaagtgt atgtcatga 500
actcaacacc accattgtgc tgcacctcg caacttctgg gagctcctca 550
tgaacgtgaa gagggggacc tacttgccgc agacgtacat catccaggag 600
gagatggtgg tcacggagca tgtcagtac aaggaggccc tggggtcctt 650
catctaccac ctgtgcaacg ggaaagacac ctaccggctc cggcgccggg 700
caacgcggag gcgcatcaac aagcgtgggg ccaagaactg caatgccatc 750
cgccacttcg agaacacctt cgtgggtggag acgtctatct gcggggtggt 800
g 801
```

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/04011

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/12, C12N1/21, C12N5/10, C07K14/47

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/12, C12N1/21, C12N5/10, C07K14/47

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG, BIOSIS (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 5-301893, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 16 November, 1993 (16.11.93) & EP, 503297, A1 & CA, 2061148, A & US, 5512460, A & US, 5622928, A	1-4
X	JP, 7-236477, A (The Institute of Physical and Chemical Research), 12 September, 1995 (12.09.95) (Family: none)	1-2, 4
X	JP, 8-127595, A (Director General, Agency of Industrial Science and Technology), 21 May, 1996 (21.05.96) (Family: none)	1-2, 4
A	Mark, D.A. et al., "3400 new expressed sequence tags identify diversity of transcripts in human brain" Nature Genet. (1993) Vol. 4, No. 3 p.256-267	1-4
A	Liew, C.C. et al., "A catalogue of genes in the cardiovascular system as identified by expressed sequence tags" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) Vol. 91 p.10645-10649	1-4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

 Date of the actual completion of the international search
13 November, 1998 (13.11.98)

 Date of mailing of the international search report
1 December, 1998 (01.12.98)

 Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP98/04011

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl^o C12N15/12, C12N1/21, C12N5/10, C07K14/47

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl^o C12N15/12, C12N1/21, C12N5/10, C07K14/47

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG, BIOSIS (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 5-301893, A (武田薬品工業株式会社) 16. 11月. 1993 (16. 11. 93) & EP, 503297, A1 & CA, 2061148, A & US, 5512460, A & US, 5622928, A	1-4
X	JP, 7-236477, A (理化学研究所) 12. 9月. 1995 (12. 09. 95) (ファミ リーなし)	1-2, 4
X	JP, 8-127595, A (工業技術院長) 21. 5月. 1996 (21. 05. 96) (ファミ リーなし)	1-2, 4
A	Mark, D. A. et al. "3400 new expressed sequence tags identify di versity of transcripts in human brain" Nature Genet. (1993) 第4巻 第3号 p. 256-267	1-4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 11. 98

国際調査報告の発送日

01.12.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富士 良宏

4B

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Liew, C. C. et al. "A catalogue of genes in the cardiovascular system as identified by expressed sequence tags" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 第91巻 p. 10645-10649	1-4

THIS PAGE BLANK (USPTO)